Osteocalcin
^{125}I RIA Kit

For the quantitative determination of Osteocalcin

GLA Protein
Protéine GLA
GLA-Protein
Proteína GLA
Proteina GLA

Instruction Manual
Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzioni

Catalog No./REF./KAT.-NR./N° de Catálogo/Numero di Catalogo: 15065I or 15130I

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English ..... Page 1
Français 13
Deutsch 27
Español 41
Italiano 55

OSTEOCALCIN RIA KIT

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of osteocalcin in human serum or plasma by radioimmunoassay (RIA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Osteocalcin, a vitamin K-dependent protein, has been described as one of the most abundant non-collagenous proteins in bone. Osteocalcin may account for up to 3% of total bone protein and contains three amino acid residues of gamma carboxyglutamic acid (GLA), hence the designation, "bone GLA protein". BGP, or osteocalcin, is found only in bone tissue and is probably produced by the osteoblast. It is believed to play a role in the mineralization process and may be under the influence of the other calcium-regulating hormones: calcitonin, parathyroid hormone and vitamin D. Because the levels of osteocalcin are a direct reflection of bone turnover, its measurement closely correlates with the actual status of bone metabolism of the patient.[2,3]

While such measurements as alkaline phosphatase and hydroxyproline have been widely used as biochemical markers for bone metabolism, there have been significant limitations in their usefulness as specific markers for bone disease. Generally, osteocalcin correlates with alkaline phosphatase; however, because the concentration of alkaline phosphatase is contributed by the other areas of the body, (i.e. liver, gastrointestinal tract, placenta and tumors) it is not specific for bone turnover.[1,4] Increased levels of osteocalcin are found in bone diseases characterized by increased bone turnover. Osteocalcin has been found to be elevated in the following disorders: Paget's disease of the bone, cancer accompanied by bone metastases, primary hyperparathyroidism and renal osteodystrophy. Osteocalcin has the important advantage of being a specific marker for bone disease.[6] More importantly, osteocalcin levels may serve as a useful index in evaluating the therapeutic management of the patient.[5,7,8]

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin Osteocalcin RIA employs simultaneous addition of sample, rabbit anti-bovine osteocalcin antibody and 125I bovine osteocalcin followed by an overnight incubation at 2-8°C. Phase separation is accomplished by the addition of a complex of goat anti-rabbit serum, carrier rabbit serum and polyethylene glycol. The assay can be centrifuged and decanted after a two hour incubation at 2-8°C.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Osteocalcin Calibrator 0	1 vial/20 mL	1 vial/20 mL
Osteocalcin Calibrator	1 vial/1.0 mL	2 vials/1.0 mL
Osteocalcin Antiserum	1 vial/14 mL	2 vials/14 mL
^{125}I Osteocalcin	1 vial/14 mL	2 vials/14 mL
Precipitating Complex (GAR-PPT)	1 vial/ 35 mL	2 vials/ 35 mL
Osteocalcin Control	1 vial/ 1.0 mL	2 vials/ 1.0 mL
Number of tests	65	130

STORAGE: Upon receipt, and prior to reconstitution, store all reagents at 2-8°C. After reconstitution store all reagents at -15° or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 Osteocalcin calibrator 0: lyophilized reagent

BSA-borate buffer contains 0.2% sodium azide as a preservative. Reconstitute the vial with 20 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.2 Osteocalcin Calibrator: lyophilized reagent

Bovine osteocalcin calibrator, at a nominal concentration of 25 ng/mL, is diluted in BSA-borate buffer containing 0.1% sodium azide. The exact concentration value of the calibrator is assigned according to each lot. Reconstitute the vial with 1.0 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using. In order to obtain the entire calibrator curve, make serial dilutions by adding 250 µL of well mixed calibrator to 250 µL of calibrator 0. When the calibrator has a concentration of 25 ng/mL, calibrators of 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 and 0.78 ng/mL will be obtained as follows:

Add 250 µL of 25 ng/mL calibrator to 250 µL of calibrator 0 and gently mix to give 12.5 ng/mL.

Add 250 µL of 12.5 ng/mL calibrator to 250 µL of calibrator 0 and gently mix to give 6.25 ng/mL.

Add 250 µL of 6.25 ng/mL calibrator to 250 µL of calibrator 0 and gently mix to give 3.12 ng/mL.

Add 250 µL of 3.12 ng/mL calibrator to 250 µL of calibrator 0 and gently mix to give 1.56 ng/mL.

Add 250 µL of 1.56 ng/mL calibrator to 250 µL of calibrator 0 and gently mix to give 0.78 ng/mL.

This calibrator is of bovine bone origin and has been highly purified by HPLC. The calibrator demonstrates commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

4.3 Osteocalcin Antiserum: lyophilized reagent
Rabbit anti-osteocalcin serum is diluted in BSA-borate buffer containing 0.5% sodium azide. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.4 ^{125}I Osteocalcin: lyophilized reagent
Bovine osteocalcin is labeled with iodine-125 and diluted in BSA-borate buffer containing 0.5% sodium azide. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.5 Precipitating Complex (GAR-PPT): lyophilized reagent
Normal rabbit serum, pre-precipitated with goat anti-rabbit serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer with 0.1% sodium azide and other preservatives added. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

4.6 Osteocalcin Control: lyophilized reagent
BSA-borate buffer is spiked with the appropriate amount of osteocalcin to obtain a concentration within a specified range. 0.02% sodium azide is added. Reconstitute the vial with 1.0 mL of purified water, mix and allow it stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly and treat as an unknown sample. The ranges are printed on the control vial.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE
Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE
CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)
R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 1.5 µCi (55.5 kBq – Kit No. 15065) or 3 µCi (111 kBq – Kit No. 15130) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:
This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:
The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Fifty microliters, in duplicate, of serum or heparinized plasma are required for the assay.

A fasting specimen is recommended but not required. To obtain serum, collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature (20 - 25°C). To obtain plasma, use heparin as an anticoagulant when collecting the sample.

PRECAUTION: EDTA plasma yields falsely high values. Hemolysis may give lower results and should be avoided. No additives or preservatives are required to maintain the integrity of the sample. Centrifuge the blood samples for 15 minutes at 760 x g*.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(rpm)^2$

Separate the serum or plasma from the cells and place in storage tubes. Serum or plasma samples should be stored at -15°C or lower. Specimens should not be repeatedly frozen and thawed. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination.

7. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

7.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.

PRECAUTION: PLASTIC TUBES ARE NOT RECOMMENDED.

7.2 Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.

7.3 Gamma scintillation counter capable of counting iodine-125.

7.4 Vortex.

7.5 Pipetting devices:

- **a.** Micropipettors calibrated to deliver 50 µL.
- **b.** Repeating dispensers calibrated to deliver 200 µL and 500 µL.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 25°C.

8.2 Set up labeled 12 x 75 mm tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page. All volumes are in microliters.

8.3 Add reagents as follows:

- **a. Total count tubes**
  Set aside until step 4
- **b. Nonspecific binding (NSB)**
  50 µL of calibrator 0
- **c. Calibrator 0**
  50 µL of calibrator 0
  200 µL of osteocalcin antiserum
- **d. Osteocalcin calibrators**
  50 µL of osteocalcin calibrator
  200 µL of osteocalcin antiserum
- **e. Control and unknown samples**
  50 µL of sample
  200 µL of osteocalcin antiserum

8.4 Add 200 µL of ^{125}I osteocalcin to all the tubes.

8.5 Vortex the tubes gently without foaming and incubate them for 16 - 24 hours at 2 - 8°C.

8.6 Vigorously mix the precipitating complex; add 500 µL to all the tubes except the total count tubes.

8.7 Vortex the tubes gently without foaming and incubate them for 2 hours (±15 min-utes) at 2 - 8°C.

8.8 Centrifuge the tubes for 20 minutes using 760 x g* at 20 - 25°C.

8.9 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes, by inverting them for a minimum time of two minutes. Blot the tubes on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.

8.10 Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for 60 seconds or longer (see Limitations of the Procedure section).

9. PROCEDURAL COMMENTS

9.1 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.

9.2 Some manufacturers' disposable tubes yield elevated nonspecific bindings.

9.3 If you choose to aspirate the supernatant from the precipitate, be careful not to disturb the precipitate.

9.4 To completely monitor the consistent performance of an RIA, there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance:

a. Total Counts

b. Maximum Binding
Average counts per minute (CPM) of calibrator 0 Tubes / Average CPM of Total Count Tubes.

c. Nonspecific Binding
Average CPM of NSB Tubes / Average CPM of Total Count Tubes.

d. Slope of Calibrator Curve
For example, monitor the 80, 50 and 20% suppression points of the calibrator line.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(rpm)^2$

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two control samples in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be deter-mined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ±2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the control included in this kit.

11. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either a linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit'' better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B_0 versus log concentration.

11.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control, and unknown sample.

11.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.

11.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control, or unknown sample by the corrected CPM of the calibrator 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

11.4 Using three cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B_0 for the osteocalcin calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).

11.5 Draw a best-fit line through the points.

11.6 Interpolate the levels of osteocalcin in the unknown samples from the plot.

11.7 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted appropriately with calibrator 0 and assayed again.

11.8 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

11.9 Calculate maximum binding by dividing CPM of calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

TABLE II

DiaSorin Osteocalcin RIA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Total Count	18,290	18,421				
	18,552					
NSB	447	445		2.4		
	413					
calibrator 0	9,082	9,021	8,576	49.0	100.0	
	8,960					
Calibrators (ng/mL)						
0.78	8,014	7,997	7,552		88.1	
	7,979					
1.56	7,098	7,146	6,701		78.1	
	7,194					
3.12	5,878	5,861	5,416		63.2	
	5,843					
6.25	4,128	4,131	3,686		43.0	
	4,133					
12.5	2,697	2,690	2,245		26.2	
	2,683					
25	1,740	1,658	1,213		14.1	
	1,575					
Unknown Samples						
1	5,880	5,860	5,415		63.1	3.1
	5,840					
2	3,673	3,686	3,241		37.8	7.8
	3,700					

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE II and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

OSTEOCALCIN SAMPLE CALIBRATOR CURVE

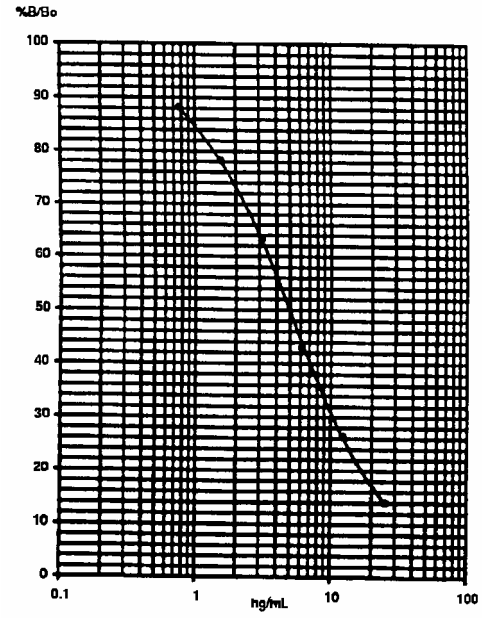

FIGURE 1

Reduction Data
The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

12.1 Counting times should be sufficient to prevent statistical error (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).

13. EXPECTED VALUES

Normal Range
Each laboratory should establish its own normal range. Normal values observed in the DiaSorin Laboratory were 4.2 ±1.2 ng/mL (n = 25). This would lead to a normal range (two standard deviations) of 1.8 - 6.6 ng/mL.

14. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at three standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is 0.2 ng/mL.

14.2 Precision

Intra Assay Variation (values = ng/mL)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	2.62	0.13	5.16
Medium	8.46	0.59	7.0
High	14.62	1.44	9.9

Inter Assay Variation (values = ng/mL)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	2.52	0.16	6.3
Medium	8.26	0.56	6.7
High	13.9	1.87	13.5

14.3 Trueness: The assay trueness has been checked by the dilution test and recovery test.

Parallelism

Sample Number	Dilution	Measured	Corrected for dilution	% Obtained
1	Undiluted	9.58	-	-
	1:2	4.36	8.72	91
	1:4	2.52	10.08	105
2	Undiluted	14.4	-	-
	1:2	6.32	12.64	87.7
	1:4	3.51	14.04	97.5
3	Undiluted	13.29	-	-
	1:2	6.77	13.54	102
	1:4	3.57	14.28	107

Accuracy

Recovery Study (values = ng/mL)

Background Value	Calibrator Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
3.98	2.5	6.48	5.49	84.7
3.98	5	8.98	7.65	85.2
3.98	7.5	11.48	10.02	87.3
3.98	10	13.98	12.26	87.7
5.55	2.5	8.05	6.90	85.7
5.55	5	10.55	9.08	86.1
5.55	7.5	13.05	11.16	85.5
5.55	10	15.55	13.32	85.7

14.4 Analytical Specificity

The cross-reactivity of the Osteocalcin system was made with the following peptides.

Peptide	% Cross-reactivity
hCalcitonin	< 0.05%
PTH 35-84	< 0.26%
γ CO_2 glutamic acid	< 0.02%
Calmodulin	<0.03%

REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow reagents to reach above 25°C. Identify tubes in duplicate.
2. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Calibrator 0	-	50 µL	50 µL	-
Calibrators (1-5)	-	-	50 µL	-
Extracted Controls	-	-	-	50 µL
Extracted Unknown Samples	-	-	-	50 µL
Antiserum			200 µL	200 µL
Tracer	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

3. Cover the tubes with parafilm and vortex gently.
4. Incubate for 16–24 hours at 2-8°C.
5. Dispense 500 µL of the GAR-PPT into all wells, except the total count tubes.
6. Cover and vortex gently.
7. Incubate for 2 hours +/- 15 minutes at 2-8°C.
8. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.
9. Decant the supernatants.
10. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$

TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE L'OSTÉOCALCINE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Cette trousse contient les instructions et les réactifs permettant d'effectuer la détermination quantitative, par dosage radio-immunologique (RIA), de l'ostéocalcine dans le sérum ou le plasma humain.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

L'ostéocalcine, une protéine vitamine K-dépendante, a été décrite comme une des protéines non collagènes les plus abondantes dans les os. L'ostéocalcine peut représenter jusqu'à 3% des protéines totales des os et contient trois résidus d'amino-acide de l'acide gamma-carboxyglutamique (GLA), d'où son nom "GLA protéine osseuse". BGP, ou ostéocalcine, est présente uniquement dans les tissus osseux et est probablement réduite par l'ostéoblaste. On pense qu'elle intervient dans le processus de minéralisation et qu'elle peut être sous l'influence des autres hormones régulatrices du calcium : calcitonine, hormone parathyroïdienne et vitamine D. Comme il y a une correspondance directe entre les taux d'ostéocalcine et la vitese de renouvellement osseux, son dosage permet de connaître l'état actuel du métabolisme osseux du patient.[2,3]

Alors que les mesures de phosphatase alcaline et d'hydroxyproline sont largement utilisées comme marqueurs biochimiques pour étudier le métabolisme osseux, leur utilisation comme marqueurs spécifiques des maladies osseuses a été significativement limitée. Généralement, il y a une corrélation entre l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline ; cependant, comme d'autres parties du corps ont une influence sur la concentration de phosphatase alcaline,(c'est-à-dire le foie, le tractus gastrointestinal, le placenta et les tumeurs) cette dernière n'est pas spécifique de la vitesse de renouvellement osseux.[1,4] On trouve des taux élevés d'ostéocalcine chez les patients souffrant de maladies osseuses qui sont caractérisées par une augmentation de la vitesse de renouvellement osseux. On trouve des taux élevés d'ostéocalcine chez les patients souffrant des maladies suivantes : Maladie osseuse de Paget, cancer avec métastases osseuses, hyperparathyroïdie primitive et ostéodystrophie rénale. Le grand avantage de l'ostéocalcine est d'être un marqueur spécifique des maladies osseuses.[6] Encore plus important, les taux d'ostéocalcine peuvent être un indice intéressant lors de l'évaluation de la prise en charge thérapeutique du patient.[5,7,8]

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

La RIA DiaSorin Ostéocalcine utilise les additions simultanées d'échantillon, d'anticorps ostéocalcine anti-bovin de lapin et d'ostéocalcine bovine marquée à l'iode 125, suivies d'une incubation pendant la nuit entre 2 et 8°C. La séparation en phases est effectuée en ajoutant un complexe de sérum anti-lapin de chèvre, du sérum de lapin porteur et du polyéthylène glycol. Le dosage peut être centrifugé et décanté après deux heures d'incubation entre 2 et 8°C.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Étalon 0 ostéocalcine	1 flacon/ 20 ml	1 flacon/ 20 ml
Étalon ostéocalcine	1 flacon/ 1,0 ml	2 flacons/1,0 ml
Antisérum ostéocalcine	1 flacon/ 14 ml	2 flacons/14 ml
^{125}I ostéocalcine	1 flacon/ 14 ml	2 flacons/ 14 ml
Complexe précipitant (GAR-PPT)	1 flacon/ 35 ml	2 flacons/35 ml
Contrôle ostéocalcine	1 flacon/ 1,0 ml	2 flacons/1,0 ml
Nombre de dosages	65	130

CONSERVATION : Dès réception, et avant reconstitution, tous les réactifs doivent être stockés entre 2 et 8°C. Après reconstitution, stocker tous les réactifs à une température inférieure ou égale à -15° jusqu'à la date de péremption sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Étalon 0 ostéocalcine : réactif lyophilisé
Tampon BSA-borate contenant 0,2% d'azide de sodium comme conservateur. Reconstituer chaque flacon avec 20 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer entre 15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.2 Étalon ostéocalcine : réactif lyophilisé

De l'étalon ostéocalcine bovine, à une concentration nominale de 25 ng/ml, est dilué dans le tampon BSA-borate contenant 0,1% d'azide de sodium. La concentration exacte de l'étalon est attribuée en fonction du lot. Reconstituer le flacon avec 1,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 - 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation. Afin d'obtenir la courbe d'étalonnage complète, effectuer des dilutions en série en ajoutant 250 µl d'étalon bien mélangé à 250 µl d'étalon 0. Quand l'étalon a une concentration de 25 ng/ml, les étalons de 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 et 0,78 ng/ml seront obtenus de la façon suivante :

Ajouter 250 µl d'étalon à 25 ng/ml à 250 µl d'étalon 0 et mélanger délicatement pour obtenir une concentration de 12,5 ng/ml.

Ajouter 250 µl d'étalon à 12,5 ng/ml à 250 µl d'étalon 0 et mélanger délicatement pour obtenir une concentration de 6,25 ng/ml.

Ajouter 250 µl d'étalon à 6,25 ng/ml à 250 µl d'étalon 0 et mélanger délicatement pour obtenir une concentration de 3,12 ng/ml.

Ajouter 250 µl d'étalon à 3,12 ng/ml à 250 µl d'étalon 0 et mélanger délicatement pour obtenir une concentration de 1,56 ng/ml.

Ajouter 250 µl d'étalon à 1,56 ng/ml à 250 µl d'étalon 0 et mélanger délicatement pour obtenir une concentration de 0,78 ng/ml.

Cet étalon contient des os d'origine bovine et a été hautement purifié par CLHP. L'étalon démontre sa commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'il est utilisé avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

4.3 Antisérum ostéocalcine : réactif lyophilisé

Le sérum anti-ostéocalcine de lapin est dilué dans un tampon BSA-borate contenant 0,5% d'azide de sodium. Reconstituer le flacon avec 14 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 - 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.4 ^{125}I ostéocalcine : réactif lyophilisé

L'ostéocalcine bovine est marquée à l'iode 125 et diluée dans un tampon BSA-borate contenant 0,5% d'azide de sodium. Reconstituer le flacon avec 14 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 - 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.5 Complexe précipitant (GAR-PPT) : réactif lyophilisé
Sérum de lapin normal, pré-précipité avec du sérum anti-lapin de chèvre et du polyéthylène glycol (PEG), dilué dans un tampon BSA-borate contenant 0,1% d'azide de sodium et d'autres conservateurs. Reconstituer le flacon avec 35 ml d'eau purifiée ; bien mélanger jusqu'à ce que la suspension apparaisse homogène puis laisser reposer pendant 30 minutes minimum à température ambiante en mélangeant de temps en temps.

4.6 Contrôle ostéocalcine : réactif lyophilisé
Tampon BSA-borate dopé avec la quantité correcte d'ostéocalcine pour obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. Ajout de 0,02% d'azide de sodium. Reconstituer le flacon avec 1,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15-20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger et traiter comme un échantillon inconnu. Les intervalles figurent sur l'étiquette du flacon de contrôle

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.
Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

REACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)
R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.
R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.
S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

REACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125
Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1,5 µCi (55,5 kBq – Trousse No. 15065) ou 3 µCi (111 kBq – Trousse No. 15130) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :
Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques

ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT: Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Cinquante microlitres de sérum ou de plasma hépariné, en doublet, sont requis pour le dosage.

Un échantillon à jeun est recommandé, mais pas obligatoire. Pour obtenir le sérum, prélever le sang par ponction veineuse dans un tube en verre à vide de 5 ou 10 ml. Laisser le sang coaguler à température ambiante (20 - 25°C). Pour obtenir le plasma, utiliser de l'héparine comme coagulant lors du prélèvement de l'échantillon.

PRÉCAUTION : Le plasma sur EDTA donne des résultats faussement élevés. L'hémolyse peut donner des résultats plus faibles et doit être évitée. Aucun additif ou conservateur n'est requis pour maintenir l'intégrité de l' échantillon. Centrifuger les échantillons sanguins pendant 15 minutes à 760 x g*.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (rayon en cm) $(tr/min)^2$

Séparer le sérum ou le plasma dans les cellules et mettre dans des tubes de stockage. Conserver les échantillons de sérum ou de plasma à une température inférieure ou égale à -15°C. Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé. Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés.

7. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

7.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.

PRÉCAUTION : ON NE CONSEILLE PAS D'UTILISER DES TUBES EN PLASTIQUE.

7.2 Centrifugeuse à thermostat pour tubes 12 x 75 mm.

7.3 Compteur de scintillation gamma pouvant mesurer l'iode 125.

7.4 Vortex.

7.5 Pipettes :

a. Micropipettes calibrées pour distribuer 50 µl.

b. Distributeurs à répétition calibrés pour distribuer 200 µl et 500 µl.

8. PROCÉDURE DE DOSAGE

8.1 Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux réactifs congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C.

8.2 Installer des tubes 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le profil de dosage de la dernière page. Tous les volumes sont en microlitres.

8.3 Ajouter les réactifs comme suit :

a. Tubes de numération totale
Laisser de côté jusqu'à l'étape 4

b. Liaison non spécifique (NSB)
50 µl d'étalon 0

c. étalon 0
50 µl d'étalon 0
200 µl d'antisérum ostéocalcine

d. Étalons ostéocalcine
50 µl d'étalon ostéocalcine
200 µl d'antisérum ostéocalcine

e. Contrôle et échantillons inconnus
50 µl d'échantillon
200 µl d'antisérum ostéocalcine

8.4 Ajouter 200 µl de 125I ostéocalcine dans tous les tubes.

8.5 Mélanger doucement les tubes à l'aide du vortex sans former de mousse et les incuber pendant 16 - 24 heures à 2 - 8°C.

8.6 Mélanger vigoureusement le complexe précipitant ; ajouter 500 µl dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.

8.7 Mélanger doucement les tubes à l'aide du vortex sans former de mousse et les incuber 2 heures (±15 minutes) à 2 - 8°C.

8.8 Centrifuger les tubes pendant 20 minutes à 760 x g* à 20 - 25°C.

8.9 Décanter immédiatement le surnageant dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale, en les renversant pendant deux minutes minimum. Placer les tubes sur du papier absorbant pour éliminer toutes les gouttes de surnageant qui peuvent rester sur les bords avant de les replacer à l'endroit.

8.10 Utiliser un compteur de scintillation gamma pour effectuer la numération du précipité dans chaque tube et des tubes de numération totale pendant 60 secondes minimum (consulter la section Limitations de la procédure).

9. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

9.1 Ajouter chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube de dosage pour garantir le mélange complet des réactifs.

9.2 Certains fabricants vendent des tubes jetables qui donnent des liaisons non spécifiques élevées.

9.3 Si le surnageant est aspiré dans le précipité, prendre soin de ne pas remuer le précipité.

9.4 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère un contrôle des paramètres suivants pour garantir la précision constante de la trousse.

a. Numérations totales

b. Liaison maximale
Numérations moyennes par minute (CPM) des tubes de l'étalon 0 / CPM moyenne des tubes de numération totale.

c. Liaison non spécifique
CPM moyenne des tubes NSB / CPM moyenne des tubes de numération totale.

d. Pente de la courbe d'étalonnage
Par exemple, surveiller les points d'inhibition de 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (rayon en cm) $(tr/min)^2$

10. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux contrôles à chaque dosage pour garantir la validité de chaque résultat de dosage. Déterminer ensuite la moyenne et l'écart-type pour chaque contrôle, sur un minimum de dix dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'intervalle ±2 écarts-types par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle des valeurs pour les contrôles de cette trousse.

11. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux “adaptés” à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul utilisée par le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B_0 par rapport à la concentration logarithmique.

11.1 Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.

11.2 Soustraire la CPM moyenne des tubes NSB de toutes les numérations.

11.3 Diviser la CPM corrigée de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par la CPM corrigée de l'étalon 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

11.4 En utilisant du papier semi-logarithmique ou logarithmique à trois cycles, tracer le pourcentage B/B_0 pour les étalons ostéocalcine (axe vertical) par rapport à la concentration (axe horizontal).

11.5 Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.

11.6 Interpoler les niveaux d'ostéocalcine dans les échantillons inconnus à l'aide du tracé.

11.7 Si un échantillon inconnu est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé de nouveau.

11.8 Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.

11.9 Calculer la liaison maximale en divisant la CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

TABLEAU II

Données d'échantillon RIA ostéocalcine DiaSorin

Tube	Doublet CPM	Moyenne CPM	Corrigée CPM	Pourcentage Liaison (B/T)	Pourcentage (B/B_0)	Conc. (ng/ml)
Numération totale	18,290	18,421				
	18,552					
NSB	447	445		2,4		
	413					
étalon 0	9,082	9,021	8,576	49,0	100,0	
	8,960					
Étalons (ng/ml)						
0,78	8,014	7,997	7,552		88,1	
	7,979					
1,56	7,098	7,146	6,701		78,1	
	7,194					
3,12	5,878	5,861	5,416		63,2	
	5,843					
6,25	4,128	4,131	3,686		43,0	
	4,133					
12,5	2,697	2,690	2,245		26,2	
	2,683					
25	1,740	1,658	1,213		14,1	
	1,575					
Échantillons inconnus						
1	5,880	5,860	5,415		63,1	3,1
	5,840					
2	3,673	3,686	3,241		37,8	7,8
	3,700					

Des données d'échantillon typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU II et à la FIGURE 1 ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

COURBE D'ETALONNAGE DE L'ECHANTILLON D'OSTEOCALCINE

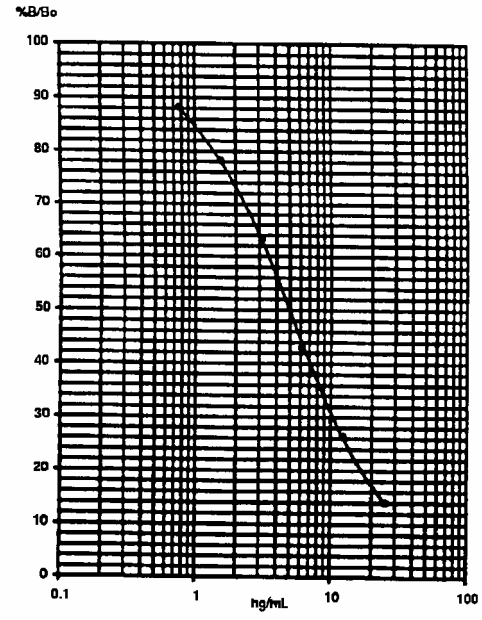

FIGURE 1

Traitement des résultats
Le laboratoire CQ DiaSorin utilise un programme d'ajustement de courbe cubique (smoothed spline curve fit)

12. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

12.1 Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 % ; 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).

13. VALEURS ESCOMPTÉES

Valeurs normales

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. Le laboratoire DiaSorin a obtenu un intervalle des valeurs normales observées de 4,2 ±1,2 ng/ml (n = 25). Ce qui donnerait un intervalle de référence de (deux écarts-types) 1,8 - 6,6 ng/ml.

14. CRITÉRES DE QUALITÉ

14.1 Sensibilité analytique

Définie comme la concentration obtenue à trois écarts-types de l'activité de liaison maximale, la quantité minimale décelable est de 0,2 pg/ml.

14.2 Précision

Variation intra-essai (valeurs = ng/ml)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Petit	2,62	0,13	5,16
Moyen	8,46	0,59	7,0
Élevé	14,62	1,44	9,9

Variation intra-essai (valeurs = ng/ml)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Petit	2,52	0,16	6,3
Moyen	8,26	0,56	6,7
Élevé	13,9	1,87	13,5

14.3 Pureté : La pureté du dosage a été vérifiée par le test de dilution et de récupération.

Parallélisme

Numéro d'échantillon	Dilution	Mesurée	Valeur corrigée	% obtenu
1	Non dilué	9,58	-	-
	1:2	4,36	8,72	91
	1:4	2,52	10,08	105
2	Non dilué	14,4	-	-
	1:2	6,32	12,64	87,7
	1:4	3,51	14,04	97,5
3	Non dilué	13,29	-	-
	1:2	6,77	13,54	102
	1:4	3,57	14,28	107

Exactitude

Étude de la récupération (valeurs = ng/ml)

Valeur de référence	Etalon ajouté	Valeur escomptée	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
3,98	2,5	6,48	5,49	84,7
3,98	5	8,98	7,65	85,2
3,98	7,5	11,48	10,02	87,3
3,98	10	13,98	12,26	87,7
5,55	2,5	8,05	6,90	85,7
5,55	5	10,55	9,08	86,1
5,55	7,5	13,05	11,16	85,5
5,55	10	15,55	13,32	85,7

14.4 Spécificité analytique

La réaction croisée du système ostéocalcine a été évaluée à l'aide des peptides suivants.

Peptide	% réaction croisée
hCalcitonine	< 0,05%
PTH 35-84	< 0,26%
γ CO_2 glutamique	< 0,02%
Calmoduline	<0,03%

CONSULTER LA DERNIÈRE PAGE POUR LES RÉFÉRENCES

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C. Identifier les tubes en double.
2. Distribuer les réactifs conformément au profil.

Tubes/réactifs	Tubes de numération totale	NSB	Étalon 0-5	Contrôles et échantillons inconnus
Étalon 0	-	50 µl	50 µl	-
Étalons (1-5)	-	-	50 µl	-
Contrôles extraits	-	-	-	50 µl
Échantillons inconnus extraits	-	-	-	50 µl
Antisérum			200 µl	200 µl
Traceur	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

3. Couvrir les tubes à l'aide d'un parafilm et agiter doucement à l'aide du vortex.
4. Incuber pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8°C.
5. Distribuer 500 µl de GAR-PPT dans tous les puits, à l'exception des tubes de numération totale.
6. Couvrir et mélanger doucement à l'aide du vortex.
7. Incuber pendant 2 heures +/- 15 minutes entre 2 et 8°C.
8. Centrifuger à 760 x g* pendant 20 minutes.
9. Décanter les surnageants.
10. Compter chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes ou plus.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (rayon en cm) $(tr/min)^2$

OSTEOCALCIN RIA KIT

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN - VITRO* DIAGNOSTIK

Diese Packung enthält Anleitungen und Material für die quantitative Bestimmung von Osteocalcin im Humanserum oder Plasma mit dem Radioimmunoassay (RIA).

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Osteocalcin, ein Vitamin-K abhängiges Protein, wurde als eines der im Knochen am meisten vorkommenden nicht-kollagenen Proteine beschrieben. Osteocalcin kann bis zu 3% der gesamten Knochenproteine ausmachen und enthält drei Aminosäurereste von Gamma-Carboxyglutaminsäure (GLA), daher die Bezeichnung "GLA Knochenprotein". BGP oder Osteocalcin findet sich nur im Knochengewebe und wird wahrscheinlich von den Osteoblasten erzeugt. Es wird angenommen, dass es eine Rolle beim Mineralisationsprozess spielt und dass es von den anderen Hormonen, die den Calcium-Haushalt regulieren, beeinflusst wird: Calcitonin, Parathormon und Vitamin-D. Da die Osteocalcinspiegel eine direkte Folge des Knochen - Turnovers sind, gibt ihre Messung den besten Hinweis auf den aktuellen Zustand des Knochenstoffwechsels des Patienten.[2,3]

Während Messungen wie die der alkalischen Phosphatase und von L-Hydroxyprolin weitgehend als biochemische Markers für den Knochenstoffwechsel verwendet werden, ist ihre Nützlichkeit als spezifische Markers bei Knochenkrankheiten stark eingeschränkt. Im Allgemeinen steht Osteocalcin in Wechselbeziehung zur alkalischen Phosphatase; da jedoch andere Körperbereiche (z.B. Leber, Magen-Darm-Kanal, Plazenta und Tumore) zur Konzentration der alkalischen Phosphatase beitragen, kann das nicht als spezifisch für den Knochen - Turnover angesehen werden.[1,4] Erhöhte Osteocalcin - Spiegel finden sich bei Knochenkrankheiten, die durch verstärkten Knochen - Turnover bedingt sind. Hohe Osteocalcin Spiegel zeigen sich bei folgenden Erkrankungen: Paget Syndrom, Krebs mit Knochenmetastasen, primärer Hyperparathyroidismus und renale Osteodystrophie. Osteocalcin hat den großen Vorteil, ein spezifischer Marker für Knochenkrankheiten zu sein.[6] Weit wichtiger jedoch ist, dass die Osteocalcin - Spiegel ein wichtiger Index bei der Auswertung des therapeutischen Patientenmanagement sind.[5,7,8]

3. TESTPRINZIP

Das DiaSorin Osteocalcin RIA verwendet die Simultanaddition von Proben, Hase-anti-Rinder Osteocalcin-Antikörper und ^{125}I Rinder-Osteocalcin, gefolgt von einer Übernacht -Inkubation bei 2-8°C. Die Phasentrennung wird abgeschlossen durch Zugabe eines Komplexes von Esel-anti-Ziege-Serum, Träger-Hasenserum und Polyethylenglykol. Der Test kann nach zwei Stunden Inkubation bei 2-8 °C zentrifugiert und dekantiert werden.

4. KITREAGENZIEN

Osteocalcin Nullkalibrator	1 Fläschchen/ 20 ml	1 Fläschchen/ 20 ml
Osteocalcin Kalibrator	1 Fläschchen/ 1,0 ml	2 Fläschchen/1,0 ml
Osteocalcin Antiserum	1 Fläschchen/ 14 ml	2 Fläschchen/14 ml
^{125}I Osteocalcin	1 Fläschchen/ 14 ml	2 Fläschchen/14 ml
Präzipitierender Komplex (GAR-PPT)	1 Fläschchen/ 35 ml	2 Fläschchen/35 ml
Osteocalcin Kontrolle	1 Fläschchen/ 1,0 ml	2 Fläschchen/ 1,0 ml
Anzahl der Tests	65	130

LAGERUNG: Nach Empfang und vor der Rekonstitution alle Reagenzien bei 2-8°C aufbewahren. Nach der Rekonstitution sind dagegen alle Reagenzien bis zum Verfallsdatum bei -15° oder bei tieferen Temperaturen zu lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 Osteocalcin Kalibrator 0: lyophilisiertes Reagenz
BSA-Boratpuffer enthält 0.2% Natriumazid als Konservierungsmittel. Jedes Fläschchen mit 20 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.2 Osteocalcin Kalibrator: lyophilisiertes Reagenz
Rinder-Osteocalcin-Kalibrator wird mit einer nominalen Konzentration von 25 ng/ml in einem BSA-Boratpuffer mit 0.1% Natriumazid verdünnt. Der genaue Konzentrationswert wird entsprechend jeder Charge bestimmt. Jedes Fläschchen mit 1.0 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen. Um die vollständige Eichkurve zu erhalten, nehmen Sie Reihenverdünnungen vor durch Zugabe von 250 µL gut gemischten Kalibrator zu einer Menge von 250 µL Nullkalibrator. Sobald der Kalibrator eine Konzentration von 25 ng/ml erreicht, können die Kalibratoren mit 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 und 0.78 ng/ml auf folgende Weise erzielt werden:
250 µL des 25 ng/ml Kalibrators zu 250 µL des Nullkalibrators geben und vorsichtig mischen, um 12.5 ng/m zu erhalten.
250 µL des 12.5 ng/mL Kalibrators zu 250 µL des Nullkalibrators geben und vorsichtig mischen, um 6.25 ng/ml zu erhalten.
250 µL des 6.25 ng/ml Kalibrators zu 250 µL des Nullkalibrators geben und vorsichtig mischen, um 3.12 ng/m zu erhalten.
250 µL des 3.12 ng/ml Kalibrators zu 250 µL des Nullkalibrators geben und vorsichtig mischen, um 1.56 ng/ml zu erhalten.
250 µL des 1.56 ng/ml Kalibrators zu 250 µL des Nullkalibrators geben und vorsichtig

mischen, um 0.78 ng/ml zu erhalten.
Dieser Kalibrator stammt von Rinderknochen und ist hochrein durch das HPLC-Verfahren. Der Kalibrator ist mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *In-vitro*- Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.3 Osteocalcin Antiserum: lyophilisiertes Reagenz
Hase-anti-Osteocalcin-Serum wird in einem BSA-Boratpuffer mit 0.5% Natriumazid verdünnt. Jedes Fläschchen mit 14 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.4 ^{125}I Osteocalcin: lyophilisiertes Reagenz
Rinder-Osteocalcin wird mit Jod-125 markiert und in einem BSA-Boratpuffer mit 0.5% Natriumazid verdünnt. Jedes Fläschchen mit 14 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.5 Präzipitierender Komplex (GAR-PPT): lyophilisiertes Reagenz
Normales Hasenserum, ausgefällt mit Ziege-anti-Hasenserum und Polyethylenglykol (PEG) wird in einem BSA-Boratpuffer mit 0.1% Natriumazid und anderen zugesetzten Konservierungsmitteln verdünnt. Jedes Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser verdünnen; gründlich mischen, bis die Suspension ganz homogen ist und dann für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und gelegentlich umrühren.

4.6 Osteocalcin Kontrolle: lyophilisiertes Reagenz
BSA-Boratpuffer wird mit der entsprechenden Menge Osteocalcin versetzt, um eine Konzentration innerhalb des angegebenen Bereichs zu erzielen. Zugabe von 0.02% Natriumazid. Jedes Fläschchen mit 1.0 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; gründlich mischen und als unbekannte Probe behandeln. Die Werte sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

VORSICHT: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden. Zur Entsorgung mit reichlichst Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuches "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Diese Packung enthält radioaktives Material mit maximal 1.5 µCi (55.5 kBq – Kit Nr. 15065) oder 3 µCi (111 kBq – Kit Nr. 15130) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.

4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

ACHTUNG: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

6. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Für den Test werden fünfzig Mikroliter Serum oder Heparinplasma im Duplikat benötigt. Eine Nüchternprobe wird empfohlen, ist jedoch nicht erforderlich. Um Serum zu erhalten, Blut durch Venenpunktion in ein 5- oder 10-ml-Glasröhrchen aufnehmen. Das Blut bei Raumtemperatur (20 - 25°C). gerinnen lassen. Bei der Blutprobe Heparin als Antikoagulanz verwenden, um Blutplasma zu gewinnen.

VORSICHT: EDTA Plasma ergibt fälschlich hohe Werte. Hämolyse ergibt niedrigere Ergebnisse und sollte vermieden werden. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit sind weder Zusatzstoffe noch Konservierungsmittel erforderlich. Die Blutproben für 15 Minuten bei 760 x g* zentrifugieren.

Das Serum oder Plasma von den Zellen trennen und in Röhrchen füllen. Serum- oder Plasmaproben bei -15 °C oder tieferen Temperaturen lagern. Proben sollten nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden. Alle mit der Probe in Kontakt gekommenen Kunststoffbehälter, Glasbehälter oder anderen Materialien sind von jeder Verunreinigung freizuhalten.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (Radius in cm) $(U/min)^2$

7. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE GERÄTE UND MATERIALIEN

7.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm.

ACHTUNG: KEINE KUNSTSTOFFRÖHRCHEN VERWENDEN.

7.2 Temperaturgesteuerte Zentrifuge für 12 x 75 mm Röhrchen.

7.3 Gammaszillilationszähler zur Messung von Jod-125.

7.4 Vortex.

7.5 Pipettiergeräte:

a. Auf die Abgabe von 50 µl geeichte Mikropipetten.

b. Multipipetten mit Einstellungen zur Abgabe von 200 µl und 500 µl.

8. TESTABLAUF

8.1 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden.

8.2 Beschriftete 12 x 75 mm Glasröhrchen gemäß Testschema auf der Rückseite in doppelter Ausführung vorbereiten. Alle Volumen sind in Mikroliter angegeben.

8.3 Reagenzien wie folgt zugeben:

a. Totalaktivität-Röhrchen
Bis Schritt 4 beiseite legen.

b. Nichtspezifische Bindung (NSB)
50 µL Nullkalibrator

c. Nullkalibrator
50 µL Nullkalibrator
200 µL Osteocalcin Antiserum

d. Osteocalcin Kalibratoren
50 µL Osteocalcin Kalibrator
200 µL Osteocalcin Antiserum

e. Kontrollen und unbekannte Proben
50 µL Probe
200 µL Osteocalcin Antiserum

8.4 200 µl 125I Osteocalcin zu allen Röhrchen zugeben.

8.5 Vorsichtig die Röhrchen ohne Schaumbildung vortexen und 16 - 24 Stunden lang bei 2 - 8°C inkubieren.

8.6 Den präzipitierende Komplex gründlich mischen; 500 µl zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen zugeben.

8.7 Vorsichtig die Röhrchen ohne Schaumbildung vortexen und 2 Stunden lang (±15 Minuten) bei 2 - 8°C inkubieren.

8.8 Alle Röhrchen 20 Minuten lang mit 760 x g* bei 20 – 25 °C zentrifugieren.

8.9 Die Überstände außer bei den Totalaktivität-Röhrchen sofort dekantieren und dieselben dazu zweimal für mindestens zwei Minuten umdrehen. Bevor Sie die Röhrchen aufrecht stellen, die Röhrchen auf Saugpapier abtupfen, um alle eventuellen Tropfen von Überständen auf den Rändern zu entfernen.

8.10 Mit einem Gammaszillilationszähler das Präzipitat jedes Röhrchens und der Totalaktivität-Röhrchen für 60 Sekunden oder länger messen (Siehe "Grenzen des Verfahrens").

9. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

9.1 Jedes Aliquot des Reagenz in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.

9.2 Die Einweg-Röhrchen einiger Hersteller führen zu hohen nicht-spezifische Bindungen.

9.3 Falls Sie es vorziehen, den Überstand vom Präzipitat abzusaugen, achten Sie dabei sorgfältig darauf, das letztere nicht aufzurühren.

9.4 Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt die regelmäßige Überprüfung der folgenden Parameter, um sicherzustellen, dass die Leistung des Kits konsistent ist:

a. Totalaktivität

b. Maximale Bindung
Durchschnittliche Zählungen pro Minute (CPM) des Nullkalibrator-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.

c. Nichtspezifische Bindung
Durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.

d. Steilheit der Eichkurve
Überwachen Sie zum Beispiel die 80%-, 50%- und 20%-Suppressions-Punkte der Eichkennlinie.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (Radius in cm) $(U/min)^2$

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedem Labor wird empfohlen, bei jedem Assay mindestens zwei Kontrollproben mitzutesten, um die Gültigkeit aller Testergebnisse zu gewährleisten. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn (10) Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertbereich kann dann für diese Kontrollen mit ± 2 Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in diesem Kit enthaltenen Kontrollen einen Bereich ermittelt.

11. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Eichkurve angelegt, indem der Umfang der Bindung gegen die angegebenen Konzentrationen der Eichkalibratoren aufgetragen wird. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Assays ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin Qualitätskontrolllabor ist % B/B_0 gegen log Konzentration.

11.1 Berechnen Sie die durchschnittliche CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe.

11.2 Die durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.

11.3 Die korrigierte CPM jedes Kalibrators, jeder Kontrolle oder unbekannten Probe durch die korrigierte CPM des Nullkalibrators teilen.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekannten Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

11.4 Auf halblogarithmischem oder doppeltlogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B_0 für die Osteocalcin-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.

11.5 Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade legen.

11.6 Die Osteocalcinspiegel in den unbekannten Proben aus dem Kurvendiagramm interpolieren.

11.7 Wenn die Werte einer unbekannten Probe höher sind als die größten Kalibratorwerte, ist die unbekannte Probe entsprechend mit Nullkalibrator zu verdünnen und neu zu testen.

11.8 Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, muss der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

11.9 Die maximale Bindung wird berechnet, indem die CPM des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen durchschnittlichen Gesamtzählungen dividiert wird.

TABELLE II

DiaSorin Osteocalcin RIA Probendaten

Röhrchen	Doppelte CPM	Durchschn. CPM	Korrigiert CPM	Prozent gebunden (B/T)	Prozent (B/B_0)	Konz. (ng/ml)
Totalaktivität	18,290	18,421				
	18,552					
NSB	447	445		2.4		
	413					
Nullkalibrator	9,082	9,021	8,576	49.0	100,0	
	8,960					
Kalibratoren (ng/ml)						
0,78	8,014	7,997	7,552		88,1	
	7,979					
1,56	7,098	7,146	6,701		78,1	
	7,194					
3,12	5,878	5,861	5,416		63,2	
	5,843					
6,25	4,128	4,131	3,686		43,0	
	4,133					
12,5	2,697	2,690	2,245		26,2	
	2,683					
25	1,740	1,658	1,213		14,1	
	1,575					
Unbekannte Proben						
1	5,880	5,860	5,415		63,1	3,1
	5,840					
2	3,673	3,686	3,241		37,8	7,8
	3,700					

Typische Probendaten und eine Eichkurve werden in TABELLE II und ABBILDUNG 1 gezeigt; diese Informationen dienen nur als Beispiel und sollten nicht zur Berechnung von Probenwerten verwendet werden.

BEISPIEL EINER OSTEOCALCIN-EICHKURVE

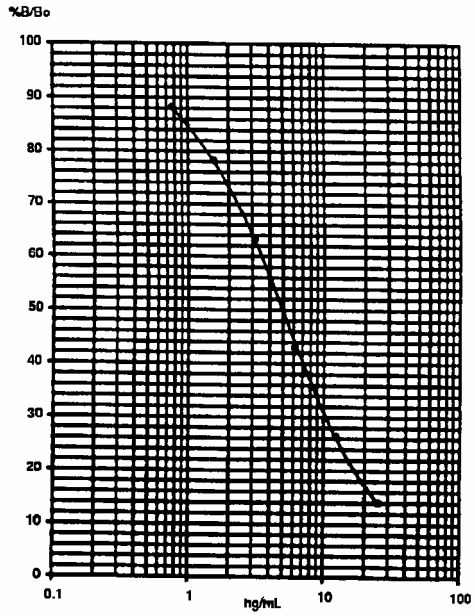

ABBILDUNG 1

Datenreduktion
Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

12.1 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu vermeiden (eine Häufung von 2.000 CPM ergibt z. B. 5 % Fehler; 10.000 CPM ergeben 1 % Fehler).

13. ERWARTETE WERTE

Normalbereich

Jedem Labor wird die Ermittlung eines eigenen Normalbereichs empfohlen. Die im DiaSorin Labor eingehaltenen Normalwerte waren 4.2 ±1.2 ng/ml (n = 25). Das führt zu einem Normalbereich (zwei Standardabweichungen) von 1.8 - 6.6 ng/ml.

14. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

14.1 Analytische Sensitivität

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die scheinbare Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird, beträgt sie 0,2 pg/ml.

14.2 Genauigkeit

Intra-Testvarianz (Werte = ng/ml).

Probennummer	Mittelwert	S.A.	% V.K.
Niedrig	2,62	0,13	5,16
Mittel	8,46	0,59	7,0
Hoch	14,62	1,44	9,9

Inter-Testvarianz (Werte = ng/ml).

Probennummer	Mittelwert	S.A.	% V.K.
Niedrig	2,52	0,16	6,3
Mittel	8,26	0,56	6,7
Hoch	13,9	1,87	13,5

14.3 Richtigkeit: Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Verdünnungs- und Wiederfindungstests überprüft.

Linearität

Probennummer	Verdünnung	Gemessen	Berichtigt nach Verdünnung	% Erzielt
1	Unverdünnt	9,58	-	-
	1:2	4,36	8,72	91
	1:4	2,52	10,08	105
2	Unverdünnt	14,4	-	-
	1:2	6,32	12,64	87,7
	1:4	3,51	14,04	97,5
3	Unverdünnt	13,29	-	-
	1:2	6,77	13,54	102
	1:4	3,57	14,28	107

Genauigkeit

Wiederfindungsuntersuchung (Werte = ng/ml)

Hintergrundwert	Hinzugefügter Kalibrator	Erwarteter Wert	Gemessener Wert	Prozent Wiederfindung
3,98	2,5	6,48	5,49	84,7
3,98	5	8,98	7,65	85,2
3,98	7,5	11,48	10,02	87,3
3,98	10	13,98	12,26	87,7
5,55	2,5	8,05	6,90	85,7
5,55	5	10,55	9,08	86,1
5,55	7,5	13,05	11,16	85,5
5,55	10	15,55	13,32	85,7

14.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des Osteocalcin-Systems wurde mit den folgenden Peptiden ermittelt.

Peptid	% Kreuzreaktivität
hCalcitonin	< 0,05%
PTH 35-84	< 0,26%
γ CO_2 Glutaminsäure	< 0,02%
Kalmodulin	<0,03%

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden. Röhrchen in doppelter Anordnung kennzeichnen.
2. Reagenzien nach dem folgenden Schema verteilen.

Röhrchen/Reagenzien	Totalaktivität	NSB	CAL 0-5	Kontrollen und unbekannte Proben
Nullkalibrator	-	50 µl	50 µl	-
Kalibratoren (1-5)	-	-	50 µl	-
Extrahierte Kontrollen	-	-	-	50 µl
Extrahierte unbekannte Proben	-	-	-	50 µl
Antiserum			200 µl	200 µl
Tracer	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

3. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig vortexen.
4. Für 16–24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
5. 500 µL GAR-PPT in alle Röhrchen mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
6. Abdecken und vorsichtig vortexen.
7. Für 2 Stunden +/- 15 Minuten bei 2-8 °C inkubieren.
8. Mit 760 x g* 20 Minuten lang zentrifugieren.
9. Die Überstände dekantieren.
10. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden oder länger in einem Gamma-Zähler zählen.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (Radius in cm) $(U/min)^2$

EQUIPO RIA PARA OSTEOCALCINA

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

Este equipo contiene instrucciones y materiales para la determinación cuantitativa de osteocalcina en suero o plasma humano mediante radioinmunoensayo (RIA).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La osteocalcina, una proteína dependiente de la vitamina K, ha sido descrita como una de las proteínas no de colágeno más abundantes en los huesos. La osteocalcina puede suponer hasta un 3% de la proteína total del hueso y contiene tres residuos de aminoácido de ácido carboxiglutámico gamma (GLA), de ahí su designación como, «proteína GLA ósea». La BGP, u osteocalcina, se encuentra sólo en el tejido óseo y su producción se debe probablemente al osteoblasto. Se cree que desempeña un papel en el proceso de mineralización y puede estar bajo la influencia de otras hormonas reguladoras del calcio: calcitonina, hormona paratiroidea y vitamina D. Dado que los niveles de osteocalcina ejercen un reflejo directo en el recambio metabólico de los huesos, su medida se relaciona estrechamente con el estado real del metabolismo óseo del paciente.[2,3]

Aunque estas mediciones de fosfatasa alcalina e hidroxipolina han sido utilizadas ampliamente como marcadores bioquímicos del metabolismo óseo, se han presentado importantes limitaciones en cuanto a su utilidad como marcadores específicos de las enfermedades óseas. Por lo general, la osteocalcina se correlaciona con la fosfatasa alcalina; sin embargo y debido a que la concentración de fosfatasa alcalina recibe la contribución de otras partes del cuerpo (por ejemplo, hígado, tracto gastrointestinal, placenta y tumores) no es específica del recambio metabólico de los huesos.[1,4] Se han encontrado niveles elevados de osteocalcina en enfermedades óseas caracterizadas por un recambio metabólico óseo aumentado. Se ha encontrado osteocalcina elevada en las enfermedades siguientes: osteítis deformante, cáncer acompañado de metástasis ósea, hiperparatiroidismo primario y osteodistrofia renal. La osteocalcina tiene la ventaja importante de ser un marcador específico de las enfermedades óseas.[6] De modo más importante, los niveles de osteocalcina se pueden utilizar como un índice útil para evaluar la dirección terapéutica del paciente.[5,7,8]

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El RIA para osteocalcina de DiaSorin utiliza la adición simultánea de muestras, anticuerpo de osteocalcina de conejo antibovino y osteocalcina bovina 125I, seguida de una incubación nocturna a 2-8° C. La separación de fases se realiza mediante la adición de un complejo de suero de cabra anticonejo, portador de suero de conejo y polietilenglicol. El ensayo se puede centrifugar y decantar tras dos horas de incubación a 2-8° C.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibrador de osteocalcina 0	1 vial/20 mL	1 vial/20 mL
Calibrador de osteocalcina	1 vial/1,0 mL	2 viales/1,0 mL
Antisuero de osteocalcina	1 vial/14 mL	2 viales/14 mL
Osteocalcina ^{125} I	1 vial/14 mL	2 viales/14 mL
Complejo de precipitación (GAR-PPT)	1 vial/35 mL	2 viales/35 mL
Control de osteocalcina	1 vial/1,0 mL	2 viales/1,0 mL
Número de pruebas	65	130

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción y antes de su reconstitución, deben almacenarse todos los reactivos a 2-8° C. Tras la reconstitución, almacene todos los reactivos a -15° C o menos hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de vencimiento del trazador.

Cuando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibrador de osteocalcina 0: reactivo liofilizado

Tampón borato ASB con azida sódica al 0,2% como conservante. Reconstituya el vial con 20 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15 - 20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.2 Calibrador de osteocalcina: reactivo liofilizado

Calibrador de osteocalcina bovina, a concentración nominal de 25 ng/mL, diluido en tampón borato ASB con azida sódica al 0,1%. El valor de concentración exacto del calibrador se asigna en función de cada lote. Reconstituya el vial con 1,0 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15- 20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar. Para obtener la curva de calibración completa, haga diluciones en serie añadiendo 250 µL de calibrador bien mezclado a 250 µL de calibrador 0. Cuando el calibrador tenga una concentración de 25 ng/mL, se obtendrán calibradores de 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 y 0,78 ng/mL del modo siguiente:

Agregue 250 µL de calibrador 25 ng/mL a 250 µL de calibrador 0 y mezcle suavemente para dar 12,5 ng/mL.

Agregue 250 µL de calibrador 12,5 ng/mL a 250 µL de calibrador 0 y mezcle suavemente para dar 6,25 ng/mL.

Agregue 250 µL de calibrador 6,25 ng/mL a 250 µL de calibrador 0 y mezcle suavemente para dar 3,12 ng/mL.

Agregue 250 µL de calibrador 3,12 ng/mL a 250 µL de calibrador 0 y mezcle suavemente para dar 1,56 ng/mL.

Agregue 250 µL de calibrador 1,56 ng/mL a 250 µL de calibrador 0 y mezcle suavemente para dar 0,78 ng/mL.

Este calibrador es de origen de hueso de bovino y ha sido altamente purificado mediante CLAR. El calibrador ha demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utiliza con los reactivos y el procedimiento recomendados para

esta prueba de diagnóstico *in vitro*.

4.3 Antisuero de osteocalcina: reactivo liofilizado
Suero de conejo antiosteocalcina diluido en tampón de borato ASB con azida sódica al 0,5%. Reconstituya el vial con 14 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15- 20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.4 Osteocalcina ^{125}I: reactivo liofilizado
Osteocalcina bovina marcada con yodo 125 y diluida en tampón de borato ASB con azida sódica al 0,5%. Reconstituya el vial con 14 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15- 20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.5 Complejo de precipitación (GAR-PPT): reactivo liofilizado
Suero de conejo normal, pre-precipitado con suero de cabra anticonejo y polietilenglicol (PEG), diluido en tampón de borato ASB con azida sódica al 0,1% y otros conservantes añadidos. Reconstituya el vial con 35 mL de agua purificada; mezcle a fondo hasta homogenizar la suspensión y deje reposar durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando cada cierto tiempo.

4.6 Control de osteocalcina: reactivo liofilizado
Tampón de borato ASB preparado con la cantidad de osteocalcina apropiada para obtener una concentración dentro del rango especificado. Se añade azida sódica al 0,02%. Reconstituya el vial con 1,0 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo y trate la muestra como desconocida. Los rangos están impresos en el vial de control.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,» en el manual Guide-Safety Management Nº CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU. 1976

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Este equipo contiene material radiactivo que no supera 1,5 µCi (55,5 kBq – Equipo Nº 15065) o 3 µCi (111 kBq – Equipo Nº 15130) de yodo 125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se requieren cincuenta microlitros de suero o plasma heparinizado, en duplicado, para su uso en el ensayo.

Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. Para obtener el suero, recoja una muestra de sangre por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Deje que la sangre se coagule a temperatura ambiente (20- 25° C). Para obtener el plasma, utilice heparina como anticoagulante cuando tome la muestra.

PRECAUCIÓN: El plasma con EDTA produce valores falsamente altos. La hemólisis puede ofrecer resultados menores y no debe utilizarse. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Centrifugue las muestras de sangre durante 15 minutos a 760 x g*.

Separe el suero o el plasma de las células y llévelo a tubos de almacenamiento. Almacene las muestras de suero o plasma a -15° C o menos. Los especímenes no deben someterse repetidamente a ciclos de congelación y descongelación. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación.

7. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

7.1 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.

PRECAUCIÓN: NO SE RECOMIENDA EL USO DE TUBOS DE PLÁSTICO.

7.2 Centrífuga controlada por temperatura con capacidad para 12 tubos de 12 x 75 mm.

7.3 Contador de centelleo de rayos gamma válido para yodo 125.

7.4 Vórtex.

7.5 Utensilios de dosificación:

a. Micropipetas calibradas para suministrar 50 µL.

b. Dispensadores repetitivos con puntas calibradas para suministrar 200 µL y 500 µL.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radio en cm) $(rpm)^2$

8. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

8.1 Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los reactivos congelados que hubiera. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 25° C.

8.2 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos de 75 mm según el programa de ensayo de la última página. Todos los volúmenes se expresan en microlitros.

8.3 Añada los reactivos de este modo:

a. Tubos de cuentas totales
Reservar aparte hasta el paso 4

b. Unión no específica (NSB)
50 µL de calibrador 0

c. Calibrador 0
50 µL de calibrador 0
200 µL de antisuero de osteocalcina

d. Calibradores de osteocalcina
50 µL de calibrador de osteocalcina
200 µL de antisuero de osteocalcina

e. Muestras de control y desconocidas
50 µL de muestra
200 µL de antisuero de osteocalcina

8.4 Añada 200 µL de osteocalcina ^{125}I a todos los tubos.

8.5 Agite los tubos suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incúbelos durante 16 - 24 horas a 2 - 8° C.

8.6 Mezcle vigorosamente el complejo de precipitación; añada 500 µL a todos los tubos salvo a los de cuentas totales.

8.7 Agite los tubos suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incúbelos durante 2 horas (±15 minutos) a 2 - 8° C.

8.8 Centrifugue los tubos durante 20 minutos con 760 x g* a 20 - 25° C.

8.9 Decante inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, salvo los de las cuentas totales, invirtiéndolos durante dos minutos como mínimo. Antes de poner los tubos boca arriba, séquelos con papel secante para eliminar cualquier gota de sobrenadante que pueda haber quedado en los bordes.

8.10 Determine el número de cuentas de precipitado de cada tubo y de los tubos de cuentas totales dejándolos en un contador de centelleo de rayos gamma durante 60 segundos como mínimo (consulte las Limitaciones de la sección Procedimiento).

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radio en cm) $(rpm)^2$

9. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

9.1 Añada cada parte alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.

9.2 Los tubos desechables de algunos fabricantes producen uniones no específicas elevadas.

9.3 Si prefiere aspirar el sobrenadante del precipitado, tenga cuidado para no alterar el precipitado.

9.4 Para asegurar completamente el resultado sólido de un RIA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar periódicamente los siguientes parámetros para asegurar el resultado uniforme del equipo:

a. Cuentas totales

b. Unión máxima
Promedio de cuentas por minuto (CPM) de los tubos de calibrador 0 / promedio de cuentas totales por minuto (CPM) de los tubos de cuentas totales.

c. Unión no específica
Promedio de CMP de los tubos NSB / Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales.

d. Pendiente de la curva del calibrador
Por ejemplo, controle los puntos de inhibición de 80, 50 y 20% de la línea del calibrador.

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos muestras de control en cada ensayo para asegurar la validez de los resultados obtenidos. Debe determinarse una desviación media y estándar para cada control con un mínimo de diez ensayos. Se puede obtener un rango de valores aceptable para estos controles usando desviaciones estándar de ±2 de los valores previamente determinados. El Laboratorio de control de calidad de DiaSorin ha determinado un rango para el control que se incluye en este equipo.

11. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibrado que relacione el alcance de la unión con diferentes concentraciones de los calibradores de calibrado. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden «ajustarse» mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del Laboratorio de control de calidad de DiaSorin es B/B0 % frente a concentración logarítmica.

11.1 Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.

11.2 Reste el promedio de CPM de los tubos NSB de todas las cuentas.

11.3 Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra desconocida por las CPM corregidas del calibrador 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra desconocida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

11.4 Con un papel gráfico semilogarítmico de 3 ciclos o log-logit, trace el B/B_0 porcentual de los calibradores de osteocalcina (eje vertical) frente a la concentración (eje horizontal).

11.5 Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.

11.6 Interpole los niveles de osteocalcina en las muestras desconocidas del trazado.

11.7 Si la lectura de cualquiera de las muestras desconocidas es mayor que el calibrador más alto, se la debe diluir correctamente con calibrador 0 y volver a realizarle el ensayo.

11.8 Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.

11.9 Calcule la unión máxima dividiendo las CPM del calibrador 0 por el promedio de cuentas totales obtenido en los tubos de cuentas totales.

TABLA II

Ejemplos de datos de un ensayo DiaSorin RIA para osteocalcina

Tubo	Duplicado CPM	Promedio CPM	Corregido CPM	Porcentaje unión (B/T)	Porcentaje (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Cuentas totales	18,290	18,421				
	18,552					
NSB	447	445		2,4		
	413					
Calibrador 0	9,082	9,021	8,576	49,0	100,0	
	8,960					
Calibradores (ng/mL)						
0,78	8,014	7,997	7,552		88,1	
	7,979					
1,56	7,098	7,146	6,701		78,1	
	7,194					
3,12	5,878	5,861	5,416		63,2	
	5,843					
6,25	4,128	4,131	3,686		43,0	
	4,133					
12,5	2,697	2,690	2,245		26,2	
	2,683					
25	1,740	1,658	1,213		14,1	
	1,575					
Muestras desconocidas						
1	5,880	5,860	5,415		63,1	3,1
	5,840					
2	3,673	3,686	3,241		37,8	7,8
	3,700					

La TABLA II y la FIGURA 1; muestran ejemplos de datos típicos de muestras y de una curva de calibrador; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

CURVA DE CALIBRADOR DE LA MUESTRA DE OSTEOCALCINA

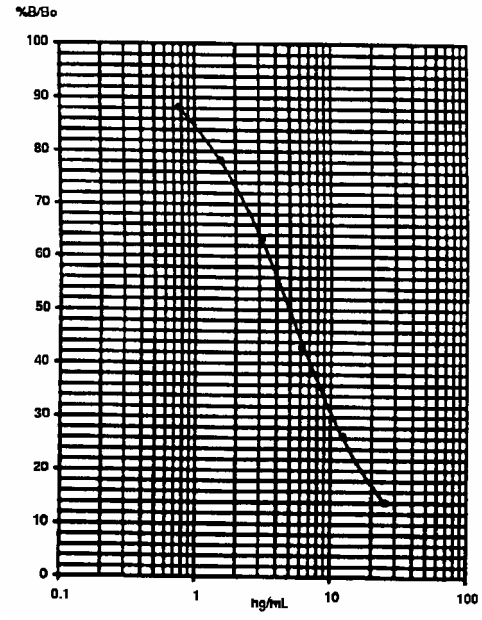

FIGURA 1

Datos de reducción
El Laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de curva spline suavizada.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

12.1 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).

13. VALORES PREVISTOS

Rango normal

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. Los valores normales observados en el Laboratorio de DiaSorin han sido de 4,2 ±1,2 ng/mL (n = 25). Este sería un rango normal (dos desviaciones estándar) de 1,8 - 6,6 ng/mL.

14. CARACTERÍSTICAS DE RESULTADO ESPECÍFICAS

14.1 Sensibilidad analítica

Cuando se la define como la concentración evidente en 2 desviaciones estándar de las cuentas con una unión máxima, la cantidad detectable mínima es 0,2 pg/mL.

14.3 Precisión

Variación intraensayo (valores = ng/mL)

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	(% CV)
Bajo	2,62	0,13	5,16
Medio	8,46	0,59	7,0
Alto	14,62	1,44	9,9

Variación entre ensayos (valores = ng/mL)

Número de la muestra	Valor de la media	D.E.	(% CV)
Bajo	2,52	0,16	6,3
Medio	8,26	0,56	6,7
Alto	13,9	1,87	13,5

14.3 Veracidad: La veracidad del ensayo se comprobó con la prueba de dilución y recuperación.

Paralelismo

Número de la muestra	Dilución	Medición	Corregida para dilución	% obtenido
1	No diluida	9,58	-	-
	1:2	4,36	8,72	91
	1:4	2,52	10,08	105
2	No diluida	14,4	-	-
	1:2	6,32	12,64	87,7
	1:4	3,51	14,04	97,5
3	No diluida	13,29	-	-
	1:2	6,77	13,54	102
	1:4	3,57	14,28	107

Exactitud

Estudio de recuperación (valores = ng/mL)

Valor de segundo plano	Calibrador agregado	Valor previsto	Valor medido	Porcentaje de recuperación
3,98	2,5	6,48	5,49	84,7
3,98	5	8,98	7,65	85,2
3,98	7,5	11,48	10,02	87,3
3,98	10	13,98	12,26	87,7
5,55	2,5	8,05	6,90	85,7
5,55	5	10,55	9,08	86,1
5,55	7,5	13,05	11,16	85,5
5,55	10	15,55	13,32	85,7

14.4 Especificidad analítica

La reactividad cruzada del sistema de osteocalcina se realizó con los siguientes péptidos.

Péptido	% de reactividad cruzada
hCalcitonina	< 0,05%
PTH 35-84	< 0,26%
γ CO_2 ácido glutámico	< 0,02%
Calmodulina	<0,03%

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 25° C. Identifique los tubos por duplicado.
2. Suministre los reactivos según el siguiente programa:

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	NSB	Cal 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibrator 0	-	50 µl	50 µL	-
Calibradores (1-5)	-	-	50 µL	-
Controles extraídos	-	-	-	50 µL
Muestras desconocidas extraídas	-	-	-	50 µL
			200 µL	200 µL
Antisuero Trazador	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

3. Cubra los tubos con parafilm y agite suavemente en vórtex.
4. Incube los tubos durante 16–24 horas a 2-8° C.
5. Suministre 500 µL de GAR-PPT en todos los pocillos, salvo en los tubos de las cuentas totales.
6. Cubra y agite suavemente en vórtex.
7. Incube los tubos durante 2 horas +/- 15 minutos a 2-8° C.
8. Centrifugue durante 20 minutos con 760 x g*.
9. Decante los sobrenadantes.
10. Cuente cada tubo en un contador gamma durante 60 segundos o más.

$*g = (1118 \times 10^{-8}) \text{ (radio en cm) } (\text{rpm})^2$

KIT RIA OSTEOCALCINA

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Questo kit contiene istruzioni e materiali per la determinazione quantitativa dell'osteocalcina nel siero o nel plasma umano mediante RIA (radioimmunoassay, radioimmunoanalisi).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

L'osteocalcina, proteina dipendente dalla vitamina K, è stata descritta come una delle proteine più abbondanti non collagenose nelle ossa. L'osteocalcina può costituire fino al 3% delle proteine totali delle ossa e contiene tre residui di aminoacidi dell'acido GLA (acido gamma carbossiglutammico), da cui deriva la designazione di "proteina GLA delle ossa". La BGP, o osteocalcina, si trova solo nel tessuto osseo ed è probabilmente prodotta dagli osteoblasti. Si ritiene svolga un ruolo nel processo di mineralizzazione, probabilmente sotto l'influenza di altri ormoni regolatori del calcio: calcitonina, ormone paratiroide e vitamina D. Poiché i livelli di osteocalcina sono uno specchio diretto del metabolismo osseo, la loro misurazione è collegata allo stato effettivo del metabolismo osseo del paziente.[2,3]

Mentre alcuni elementi di misurazione come la fosfatasi alcalina e l'idrossiprolina sono stati ampiamente utilizzati come marcatori biochimici per il metabolismo osseo, il loro impiego è stato significativamente limitato come marcatori specifici per le malattie ossee. Di solito l'osteocalcina è collegata alla fosfatasi alcalina; tuttavia, poiché contribuiscono alla concentrazione di quest'ultima le altre aree del corpo (vale a dire, fegato, tratto gastrointestinale, placenta e tumori) non è specifica del metabolismo osseo.[1,4] Livelli maggiori di osteocalcina sono riscontrati nelle malattie ossee caratterizzate da un incrementato metabolismo osseo. Elevati contenuti di osteocalcina sono stati riscontrati nelle seguenti malattie: malattia ossea di Paget, cancro accompagnato a metastasi ossea, iperparatiroidismo primario e osteodistrofia renale. L'osteocalcina presenta il vantaggio considerevole di essere un marcatore specifico delle malattie ossee.[6] Inoltre, i livelli di osteocalcina possono servire come un indice utile per la valutazione della gestione terapeutica del paziente.[5,7,8]

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

La RIA sull'osteocalcina DiaSorin utilizza l'aggiunta simultanea di campioni, l'anticorpo dell'osteocalcina antibovino del coniglio e l'osteocalcina bovina 125I, seguita da un'incubazione di una notte a 2-8°C. La separazione si ottiene mediante l'aggiunta di un complesso di siero capra anti-coniglio, di carrier di siero di coniglio e di polietilene glicolico. L'analisi può essere centrifugata e decantata dopo due ore di incubazione a 2-8°C.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratore osteocalcina 0	1 fiala/20 mL	1 fiala/20 mL
Calibratore osteocalcina	1 fiala/1,0 mL	2 fiale/1,0 mL
Antisiero osteocalcina	1 fiala/14 mL	2 fiale/14 mL
^{125}I Osteocalcina	1 fiala/14 mL	2 fiale/14 mL
Complesso precipitante (GAR-PPT)	1 fiala/ 35 mL	2 fiale/ 35 mL
Controllo osteocalcina	1 fiala/1,0 mL	2 fiale/ 1,0 mL
Numero di test	65	130

CONSERVAZIONE: Dopo il ricevimento dei reagenti e prima della ricostituzione, conservarli a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, conservare tutti i reagenti a -15° o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Calibratore osteocalcina 0: reagente liofilizzato
Il tampone BSA-borato contiene 0,2% sodio azide aggiunto come conservate. Ricostituire la fiala con 20 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente prima dell'uso.

4.2 Calibratore osteocalcina: reagente liofilizzato
Il calibratore dell'osteocalcina bovino, a concentrazione nominale di 25 ng/mL, è diluito in un tampone BSA-borato contenente 0,1% sodio azide. Il valore di concentrazione esatto del calibratore è assegnato per ogni lotto. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15 - 20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente prima dell'uso. Per ottenere l'intera curva di calibrazione, fare diluizioni in serie aggiungendo 250 µL di calibratore ben mescolato a 250 µL di calibratore 0. Quando la concentrazione del calibratore è di 25 ng/mL, i calibratori di 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 ng/mL si ottengono nel modo seguente:
Aggiungere 250 µL di calibratore 25 ng/mL a 250 µL di calibratore 0 e mescolare delicatamente per ottenere 12,5 ng/mL.
Aggiungere 250 µL di calibratore 12,5 ng/mL a 250 µL di calibratore 0 e mescolare delicatamente per ottenere 6,25 ng/mL.
Aggiungere 250 µL di calibratore 6,25 ng/mL a 250 µL di calibratore 0 e mescolare delicatamente per ottenere 3,12 ng/mL.
Aggiungere 250 µL di calibratore 3,12 ng/mL a 250 µL di calibratore 0 e mescolare delicatamente per ottenere 1,56 ng/mL.
Aggiungere 250 µL di calibratore 1,56 ng/mL a 250 µL di calibratore 0 e mescolare delicatamente per ottenere 0,78 ng/mL.
Questo calibratore è di origine ossea bovina ed è stato altamente purificato mediante HPLC. Il calibratore dimostra commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, come consigliato.

4.3 Antisiero osteocalcina: reagente liofilizzato
Il siero di coniglio anti-osteocalcina è diluito in un tampone BSA-borato contenente 0,5% sodio azide. Ricostituire la fiala con 14 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15 - 20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente prima dell'uso.

4.4 ^{125}I Osteocalcina: reagente liofilizzato
L'osteocalcina bovina è etichettata con iodio-125 e diluita in un tampone BSA-borato contenente 0,5% sodio azide. Ricostituire la fiala con 14 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15 - 20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente prima dell'uso.

4.5 Complesso precipitante (GAR-PPT): reagente liofilizzato
Il siero normale di coniglio, pre-precipitato con siero capra anti-coniglio e polietilene glicolico (PEG), è diluito in un tampone BSA-borato con 0,1% sodio azide e l'aggiunta di altri conservanti. Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua purificata; mescolare completamente fino a quando la sospensione non appare omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente, mescolando di tanto in tanto.

4.6 Controllo osteocalcina: reagente liofilizzato
Nel tampone BSA-borato si aggiungono le quantità necessarie di osteocalcina in modo da ottenere concentrazioni di controllo nei range specificati. Si aggiunge quindi sodio azide 0,02%. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente e trattare come campione non noto. I range sono stampati sulla fiala dei controlli.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO
Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE
ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, USA 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)
R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1,5 µCi (55,5 kBq - Kit n. 15065) o 3 µCi (111 kBq - Kit n. 15130) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene una sostanza chimica nota nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Sono richiesti cinquanta microlitri, in due serie, di siero o plasma eparinizzato per l'analisi.

Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio. Per ottenere il siero, raccogliere il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (20 - 25°C). Per ottenere il plasma, utilizzare eparina come anticoagulante durante la raccolta del campione.

AVVERTENZA: il plasma EDTA di solito produce valori falsamente alti. L'emolisi può determinare risultati inferiori e dovrebbe essere evitata. Non sono richiesti additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Centrifugare i campioni di sangue per 15 minuti a 760 x g*.

Separare il siero o il plasma dalle cellule e disporlo nelle provette di conservazione. I campioni di siero o plasma a devono essere conservati a una temperatura di -15°C o inferiore. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione.

7. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

7.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
AVVERTENZA: L'USO DI PROVETTE IN PLASTICA NON È CONSIGLIATO.

7.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.

7.3 Contatore ad emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

7.4 Vortex.

7.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:

a. Micropipette dosatrici calibrate per inviare 50 µL.

b. Dosatori a ripetizione calibrati per inviare 200 µL e 500 µL.

*g = (1118 x 10-8) (raggio in cm) $(rpm)^2$

8. PROCEDURA DI ANALISI

8.1 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C.

8.2 Preparare due serie di 12 provette monouso da 75 mm in vetro etichettate in base allo Schema di analisi in ultima pagina. Tutti i volumi sono in microlitri.

8.3 Aggiungere i reagenti nel seguente modo:

a. Provette per il conteggio totale
Lasciare da parte fino al punto 4

b. Provette per legame non specifico (NSB)
50 µL di calibratore 0

c. Calibratore 0
50 µL di calibratore 0

200 µL di antisiero di osteocalcina

d. Calibratori osteocalcina
50 µL di calibratore dell'osteocalcina

200 µL di antisiero di osteocalcina

e. Controllo e campioni non noti
50 µL di campione

200 µL di antisiero di osteocalcina

8.4 Aggiungere 200 µL di 125I osteocalcina in tutte le provette.

8.5 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16 - 24 ore a 2 - 8°C.

8.6 Agitare vigorosamente il complesso precipitante; aggiungere 500 µL a tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.

8.7 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 2 ore (±15 minuti) a 2 - 8°C.

8.8 Centrifugare le provette per 20 minuti utilizzando 760 x g* a 20 - 25°C.

8.9 Far decantare immediatamente i liquidi superficiali da tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale, capovolgendole per un periodo minimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali prima di riportare le provette in posizione verticale.

*g = (1118 x 10-8) (raggio in cm) $(rpm)^2$

8.10 In un contatore ad emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e le provette per il conteggio totale per 60 secondi o più (vedere: Limiti della procedura).

9. COMMENTI ALLA PROCEDURA

9.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.

9.2 Alcune provette monouso determinano legami non specifici elevati.

9.3 Se si decide di aspirare il liquido superficiale dal precipitato, fare attenzione a non smuovere quest'ultimo.

9.4 Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit:

a. Conteggi totali

b. Legame massimo
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0 / CPM medio delle provette per il conteggio totale.

c. Legame non specifico
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette NSB / CPM medio delle provette per il conteggio totale.

d. Pendenza della curva di calibrazione
Ad esempio, monitorare i punti di soppressione a 80, 50 e 20% della linea del calibratore.

10. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due campioni di controllo di ogni analisi per garantirne la validità. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci analisi. Si può quindi ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ±2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno dei quali tende ad ottenere una curva di calibrazione tracciando l'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori per la calibrazione. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, sebbene alcune analisi possano essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B_0 rispetto alla concentrazione di log.

11.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

11.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.

11.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM corretto del calibratore 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto - CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0 - CPM di NSB}} \times 100$$

11.4 Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica, tracciare la percentuale di B/B_0 per i calibratori dell'osteocalcina (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).

11.5 Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti.

11.6 Interpolare i livelli di osteocalcina nei campioni non noti dal tracciato.

11.7 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito correttamente con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.

11.8 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

11.9 Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

TABELLA II

Dati campione osteocalcina RIA DiaSorin

Provetta	Duplicato CPM	Media CPM	Corretto CPM	% Bound (B/T)	Percent. (B/B_0)	Conc. (ng/mL)
Conteggio totale	18,290	18,421				
	18,552					
NSB	447	445		2,4		
	413					
calibratore 0	9,082	9,021	8,576	49,0	100,0	
	8,960					
Calibratori (ng/mL)						
0,78	8,014	7,997	7,552		88,1	
	7,979					
1,56	7,098	7,146	6,701		78,1	
	7,194					
3,12	5,878	5,861	5,416		63,2	
	5,843					
6,25	4,128	4,131	3,686		43,0	
	4,133					
12,5	2,697	2,690	2,245		26,2	
	2,683					
25	1,740	1,658	1,213		14,1	
	1,575					
Campioni non noti						
1	5,880	5,860	5,415		63,1	3,1
	5,840					
2	3,673	3,686	3,241		37,8	7,8
	3,700					

La TABELLA II e la FIGURA 1 riportano dati di campioni tipici; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

CURVA DI CALIBRATORE DI CAMPIONE DI OSTEOCALCINA

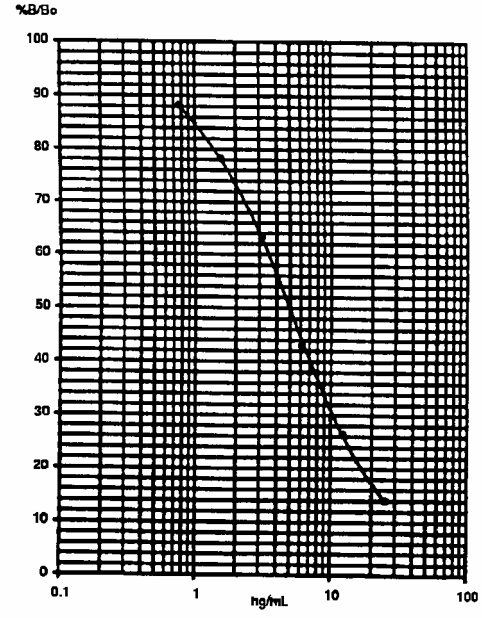

FIGURA 1

Riduzione dei dati
Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin QC utilizza una retta curvilinea uniforme.

12. LIMITI DELLA PROCEDURA

12.1 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).

13. VALORI PREVISTI

Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. I valori normali osservati nei laboratori DiaSorin erano 4,2 ±1,2 ng/mL (n = 25). Questo porterebbe ad un range normale (due deviazioni standard) di 1,8 - 6,6 ng/mL.

14. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

14.1 Sensibilità analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a tre deviazioni standard dai conteggi a legame minimo, è di 0,2 ng/mL.

14.2 Precisione

Variazione intra-analisi (valori = ng/mL)

Numero campione	Valore medio	D.S.	% C.V.
Basso	2,62	0,13	5,16
Medio	8,46	0,59	7,0
Alto	14,62	1,44	9,9

Variazione inter-analisi (valori = ng/mL)

Numero campione	Valore medio	D.S.	% C.V.
Basso	2,52	0,16	6,3
Medio	8,26	0,56	6,7
Alto	13,9	1,87	13,5

14.3 Accuratezza: l'accuratezza dell'analisi è stata controllata mediante diluizione e test di recupero.

Parallelismo

Numero campione	Diluizione	Misurato	Corretto per diluizione	% ottenuta
1	Non diluito	9,58	-	-
	1:2	4,36	8,72	91
	1:4	2,52	10,08	105
2	Non diluito	14,4	-	-
	1:2	6,32	12,64	87,7
	1:4	3,51	14,04	97,5
3	Non diluito	13,29	-	-
	1:2	6,77	13,54	102
	1:4	3,57	14,28	107

Precisione

Studio del recupero (valori = ng/mL)

Valore di fondo	Calibratore aggiunto	Valore previsto	Valore misurato	Percentuale di recupero
3,98	2,5	6,48	5,49	84,7
3,98	5	8,98	7,65	85,2
3,98	7,5	11,48	10,02	87,3
3,98	10	13,98	12,26	87,7
5,55	2,5	8,05	6,90	85,7
5,55	5	10,55	9,08	86,1
5,55	7,5	13,05	11,16	85,5
5,55	10	15,55	13,32	85,7

14.4 Specificità analitica

La reattività incrociata del sistema osteocalcina è stata eseguita con i seguenti peptidi.

Peptide	% di reattività incrociata
hCalcitonina	< 0,05%
PTH 35-84	< 0,26%
γ CO_2 acido glutammico	< 0,02%
Calmodulin	<0,03%

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Contrassegnare due serie di provette.
2. Versare il reagente seguendo lo schema seguente.

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	Cal 0-5	Controlli e campioni non noti
Calibratore 0	-	50 µl	50 µL	-
Calibratori (1-5)	-	-	50 µL	-
Controlli estratti	-	-	-	50 µL
Campioni non noti estratti	-	-	-	50 µL
Antisiero			200 µL	200 µL
Tracciatore	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

3. Coprire le provette con pellicola e agitare lentamente nel Vortex.
4. Lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
5. Versare 500 µL di GAR-PPT nei recipienti, eccetto nelle provette per il conteggio totale.
6. Coprire e agitare lentamente nel Vortex.
7. Lasciare in incubazione per 2 ore +/- 15 minuti a 2-8°C.
8. Centrifugare usando 760 x g* per 20 minuti.
9. Far decantare i liquidi superficiali.
10. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (raggio in cm) $(rpm)^2$

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA

1. Brown, J.P., L. Malaval, M.C. Chapuy, P.D. Delmas, C. Edouard and P.J. Meunier, "Serum Bone GLA-Protein: A Specific Marker for Bone Formation in Postmeno-pausal Osteoporosis,'' **Lancet,** I:1091, (1984).
2. Delmas, P.D., H.W. Wahner, K.G. Mann and B.L. Riggs, "Assessment of Bone Turnover in Postmenopausal Osteoporosis by Measurement of Serum Bone GLA-protein,'' **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 102:470, (1983).
3. Delmas, P.D., D. Stenner, H.W. Wahner, K.G. Mann and B.L. Riggs, "Increase in Serum Bone and γ-Carboxylglutamic Acid Protein with Aging in Women,'' **Journal of Clinical Investigation,** 71:1316, (1983).
4. Gundberg, C.M., J.B. Lian, P.M. Gallop and J.J. Steinberg, "Urinary γ-Carboxy-glutamic Acid and Serum Osteocalcin as Bone Markers: Studies in Osteoporosis and Paget's Disease,'' **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 57:1221, (1983).
5. Gundberg, C.M., P.S. Wilson, P.M. Gallop and A.M. Parfitt, "Determination of Osteocalcin in Human Serum: Results with Two Kits Compared with Those by a Well-Characterized Assay,'' **Clinical Chemistry,** 31(10):1720, (1985).
6. Price, P.A., J.G. Parthemore and L.J. Deftos, "New Biochemical Marker for Bone Metabolism,'' **Journal of Clinical Investigation,** 66:878, (1980).
7. Slovik, P.M., C.M. Gundberg, R.M. Neer and J.B. Lian, "Clinical Evaluation of Bone Turnover by Serum Osteocalcin Measurements in a Hospital Setting,'' Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **59:228, (1984).**
8. Zerwekh, J.E., K. Sakhaee and C.Y.C. Pak, "Short-term 1,25-dihydroxyvitamin D_3 Administration Raises Serum Osteocalcin in Patients with Postmenopausal Osteo-porosis,'' **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 60(3):615, (1985).

Symbols used with devices

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanwei-sung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura máxima	Temperatura massima
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisuero	Antisiero
Ab | PEG	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
Ag* |	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ^{125}I	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
RCNS | X	Reconstitute with X mL	Reconstituer avec X mL	Mit X ml auflösen	Reconstitución con X mL	Ricostituire con X mL
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo

*Ag: Human, Animal, Recombinant, Synthetic

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France

DiaSorin

CE

DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

27268
10416 9/03

PRINTED IN U.S.A.